

A nitrát-reduktáz enzim aktivitásának (NRA-érték) meghatározása növéymintákban

Azoknak a növényeknek a kivételével, melyek vagy N-kötő baktériumokkal élnek szimbiózisban, vagy csak ammóniát képesek N-forrásként hasznosítani, a növényekben található nitrogén a talajból felvett nitrát redukciója útján jön létre. A növények által felvett nitrát, ahhoz, hogy a fehérje-szintézis során be tudjon épülni az aminosavakba, ammóniává kell, hogy redukálódjon. Ez a redukció többlépcsős folyamat: először nitrit, majd hiponitrit, hidroxilamin, s végül ammónia keletkezik. A redukció enzimek egész sorának közvetítésével megy végbe, melyek közül az első a nitrát-reduktáz enzim (MULDER et al., 1959; BEEVERS & HAGEMAN, 1969; EILRICH & HAGEMAN, 1973; HAVILL et al., 1974; ELLENBERG, 1977; GEBAUER et al., 1988; GEBAUER, 1989).

A növény szervezetén belül működő, nitrátot redukáló enzim felépítését illetően több hipotézis létezik. BEEVERS és HAGEMAN (1969) szerint igen sok és igen sokoldalú vizsgálat eredményeiből a legvalószínűbb az a következtetés, hogy egyetlen, több komponensű enzim az, mely a redukciót katalizálja. Kémiai szerkezetét tekintve ez az enzim vagy egy flavin-adenin-nukleotid, vagy egy flavin-mono-nukleotid, mely Mo-t és Fe^{2+} -t tartalmaz. Lényeges tulajdonsága, hogy aktivitását mind a nitrát, mind a molibdén indukálja.

Ez a tulajdonság, hogy az enzim saját szubsztrátja, azaz a nitrát mennyiségétől függően képződik, irányította arra a fi-

gyelmet, hogy a növények NO_3 -hasznosítását (NO_3 -felvételét) az egyes növényi részekben található nitrát-reduktáz enzim (= NR-enzim) segítségével, ill. az erre a mennyiségre jellemző nitrát-reduktáz-aktivitással (= NRA) lehetne mérni (MULDER et al., 1959; BEEVERS & HAGEMAN, 1969; EILRICH & HAGEMAN, 1973; HAVILL et al., 1974; HAGEMAN et al., 1980).

Az NRA-értékek segítségével kísérlik meg - a növények NO_3 -felvételén keresztül - a talajok nitrogéntrágyázás hatására változó nitrátszolgáltató képességének meghatározását is (EILRICH & HAGEMAN, 1973; HAVILL et al., 1974; BIGG & DANIEL, 1978).

Nem-trágyázott körülmények között viszont csak akkor található nitrát a növényekben, ha nitrifikáció játszódik le a talajban. Így a növények NO_3 -tartalma és ezzel együtt az NRA-érték indirekt úton jelezheti a talajban lejátszódó nitrifikáció mértékét (ADAMS & ATTIVILL, 1982; GEBAUER et al., 1984, 1988).

Számos más kérdés vizsgálatánál [pl. nehézfémek - környezetszennyezés - hatása az NRA-értékek alakulására (PETROVIC et al., 1987, 1990, 1991); a növény-nemesítés területén megfelelő NO_3 -hasznosító genotípusok kiválasztása (KASTORI & PETROVIC, 1989a,b; HAGEMAN et al., 1980); a facsemeték esetében megfelelő mykorrhiza-oltóanyag kiválasztása (HO & TRAPPE, 1980)] hasznosítható az NRA-értékek alakulása.

A tápközegbe (talaj, tápoldat) NO_3^- - $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^-$ és NH_4^- -N alakjában adott nitrogén, a növények NO_3^- -tartalma és az NRA-értékek közötti kapcsolat

Azt a tényt, hogy a növények számára valamely tápközegen keresztül adagolt NO_3^- -N befolyásolja a növényekben lévő nitrát és NR-enzim mennyiségét, ill. a NRA-érték nagyságát, már több, mint húsz éve kimutatták (BEEVERS & HAGEMAN, 1969). Mivel azonban az NRA-értékek nagyon ingadoznak - amint erre GEBAUER és munkatársai (1988) Közép-Európa 14 pontján található természetes növénytársulásból vett, 48 növényfajhoz tartozó minta vizsgálatakor is rámutatott - ezért minden újabb kutatandó kérdés felmerülésekor ismételten megvizsgálják az egyes hatótényezőknek - köztük a N-forrásnak - az NRA-értékre gyakorolt hatását.

Az első kérdés, amire többen választ kerestek: hogyan befolyásolja a növények nitráttartalmát és az NRA-értékeket a tápközegbe egyszeri alkalommal, nagy mennyiségben adott NO_3^- -N. Ezt MULDER és munkatársai (1959) és HÖGBERG és munkatársai (1986) üvegházi; MELZER és munkatársai (1984) szabadban tartott tenyészedény-kísérletben, végül HAVILL és munkatársai (1974), valamint HÖGBERG és munkatársai (1986) szabadföldi körülmények között vizsgálták. Valamennyien azt tapasztalták, hogy az egyszeri, nagyadagú NO_3^- -N adagolása után 24-72 órával az egyes növényi részekben meghatározott NRA-érték a kezelés előttihez viszonyítva 2-7-szeresére nőtt. Tovább figyelve az NRA-értékek alakulását, MULDER és munkatársai (1959) és HÖGBERG és munkatársai (1986) üvegházi tápoldatos kísérletekben 6-7 nap elteltével, MELZER és munkatársai (1984) szabadban tartott tenyészedény-kísérletben pedig 24 nap elteltével a kezelt és kezeletlen - kontroll - növényekben megközelítően azonos NRA-értékeket mértek.

Az NRA-értékeknek jelzőszámként való felhasználásához az emelkedő adagokban adott NO_3^- -N és a növények nitráttartalma, valamint NRA-értékeinek változása közötti összefüggést kellett megvizsgálni. Bármilyen jellegű kísérletben (tápoldatos, tenyészedény, szabadföldi) is vizsgálták ezt az összefüggést - a túl nagy adagok kivételével - az emelkedő NO_3^- -N-adagok hatására valamennyi kísérletben a növények nitráttartalma és az NRA-értékek is emelkedtek. Míg a növények nitráttartalmában a NO_3^- -N tápközegbe történő adagolása után már rövid idővel mérhető változás jelentkezett, addig az NRA-értékek emelkedése később lépett fel. A kapcsolat az NRA-értékek és a NO_3^- -N-adagok között általában nem volt lineáris (EILRICH & HAGEMAN, 1973; CANVIN & WOO, 1979; MELZER et al., 1984; HÖGBERG et al., 1986; KASTORI & PETROVIC, 1989b; PETROVIC & KASTORI, 1990, 1991; MARTINEZ & CERDÁ, 1989).

Jóllehet számos szerző azt állítja, hogy ha N-forrásként NH_4^- -N-t alkalmaztak, akkor a növényekben nem mérhető, ill. igen kicsi az NRA-érték, vagyis az NH_4^- -N gátolja a NR-enzim aktivitását, mégis többen $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^-$ -N-t, ill. csak NH_4^- -N-t adagoltak N-forrás gyanánt kísérleteikben.

Ezekből a kísérletekből először is az látható, hogy NH_4^- -N-nel végzett trágyázás hatására is lehet a növényekben - más tényezőtől is függően - mérhető, sőt jól mérhető mennyiségben NR-enzim. Természetesen, az NH_4^- -N hatására keletkezett NR-enzim mennyisége ill. az NRA-értékek a NO_3^- -N-t is tartalmazó kezelésekkal összehasonlítva kisebbek (MULDER et al., 1959; BIGG & DANIEL, 1978; MELZER et al., 1984).

Amikor a N-tápelemet a NO_3^- -N-es kezeléssel azonos mennyiségű nitrogént tartalmazó $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^-$ -N alakjában adták, látható, hogy a $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^-$ -N növekvő adagjaira a különféle kísérleti növények

éppen úgy reagáltak, mint a csak $\text{NO}_3\text{-N}$ -nel táplált növények: vagyis nitráttartalmuk és NRA-értékeik az adagok növelésével emelkedtek (GEBAUER et al., 1987; MARTINEZ & CERDÁ, 1989; GONZÁLEZ PONCE et al., 1990).

Ha ugyanezeket az eredményeket a csak $\text{NO}_3\text{-N}$ -t kapott kezelésekkel hasonlítjuk össze, akkor láthatjuk, hogy a $\text{NO}_3\text{+NH}_4\text{-N}$ hatása a kísérleti növények száraz anyagában nem minden esetben és nem arányosan kisebb értékeket eredményez, mint a $\text{NO}_3\text{-N}$. Az NRA-értékek esetében egyértelmű a kétféle N-forrás hatása: a $\text{NO}_3\text{-N}$ kezelésekben - mely több nitrátot jelent - mindig nagyobbak az NRA-értékek, mint a $\text{NO}_3\text{+NH}_4\text{-kezelésekben}$, de az eltérés nem arányos a N-forrás $\text{NO}_3\text{-tartalmával}$ (BIGG & DANIEL, 1978; MELZER et al., 1984; MARTINEZ & CERDÁ, 1989).

A N-trágyázás és az őszi búza egyes, a N-adagolástól függő jellemzői közötti kapcsolatot vizsgálta EILRICH és HAGEMAN (1973) szabadföldi kisparcellás, és GONZÁLEZ PONCE és munkatársai (1990) szabadföldi mikroparcellás kísérletükben. A kísérleti adatok feldolgozásakor EILRICH és HAGEMAN (1973) pozitív, szignifikáns összefüggést kaptak a NRA-értékek és a levelek nitrát- és oldható proteintartalma, a föld feletti növényi részek összes ill. redukált (a nitráttartalom levonása utáni) N-tartalma, valamint a szemek proteintartalma, s végül a szemtermés között is. GONZÁLEZ PONCE és munkatársai (1990) eredményei szerint a fiatal növények szárazanyag-hozama, nitráttartalma és NRA-értékei igen szoros, szignifikáns ($r = 0,95^{**}$; $0,89^{**}$, ill. $0,87^{**}$), de nem lineáris összefüggést mutattak a vetés előtt adott, csak $\text{NH}_4\text{-N}$ -t tartalmazó trágyaadagokkal. A növények NRA-értékei és nitráttartalma között $r = 0,98^{**}$ értékű, az NRA-értékek és a szárazanyag-tartalom között $r = 0,90^{**}$ értékű szignifikáns, lineáris korreláció állt fenn. A fiatal növényekből

meghatározott NRA-értékek jól korreláltak a szalma- és szemterméssel, a szemek proteintartalmával és a proteinhozammal is.

A Mo-adagolás hatása a növényekben mérhető NRA-értékekre

Mivel fiziológiai megfigyelések szerint a magasabb rendű növények nitrát-metabolizmusában a molibdén is részt vesz (a NR-enzim prosztetikus csoportjaként), ezért MULDER és munkatársai (1959) kísérleteik során megvizsgálták, hogy Mo-hiányos talajon nevelt növények (karfiol, paradicsom, paraj) esetében utólagos Mo-adagolásra hogyan változik a növényekben meghatározható NRA-érték. Megállapították, hogy mindhárom kísérleti növény esetében néhány órával a molibdén utólagos adagolása után igen jelentősen megnőtt a növényekből kimutatható NRA-érték. Kísérletükben azt is bebizonyították, hogy a molibdén magában az enzim-indukció folyamatában vesz részt, nem pedig egy már jelenlévő proteint aktivál.

Az NRA megoszlása a növényi részek között

A magasabb rendű növények esetében a nitráttartalom, ill. az NR-enzim meghatározásához az esetek legnagyobb részében a levelekből vett mintákat használják fel. Az elemzések során általában a növények leveleiben találták a legnagyobb NRA-értékeket (pl. GEBAUER et al. (1984) már idézett, a Közép-Európa-i növényeket felmérő munkájában mindössze kilenc esetben talált nagyobb NRA-értékeket a levélnyél + főhajtás, ill. a gyökér frakcióban, mint a levelekben). Továbbá a levelekből - szintén lényeges szempont - könnyű mintát venni (BEEVERS & HAGEMAN, 1969; EILRICH &

HAGEMAN, 1973; BIGG & DANIEL, 1978; HO & TRAPPE, 1980; MARTINEZ & CERDÁ, 1989).

A növényeknek azonban minden részében található nitrát és NR-enzim. Amikor a növény nitrát-metabolizmusát részleteiben is meg kívánják vizsgálni, külön-külön megelemezik a levéllemezeket, levélnyeleket és gyökereket. GEBAUER és munkatársai (1984) tenyésztényekben nevelt *Rumex obtusifolius* L. növényeknél a legnagyobb NRA-értékeket a levéllemezekben mérték, a levél-nyelek átlagos NRA-értéke ennek csak 44 %-át, a gyökerekből mért NRA pedig csak 12 %-át tette ki. Még átfogóbb képet kaphatunk az arányokról GEBAUER és munkatársai (1988) cikkéből, ahol mindazonnál a növénytípusoknál, melyekben a levéllemezekben találták a legnagyobb NRA-értékeket, a hozzájuk tartozó levél-nyél + főhajtásokban az előbbi értékek 3-66 %-át, a gyökerekben pedig 2-62 %-át mérték.

Ez azonban nem jelenti azt, hogy minden vizsgálatnál az a célszerű, ha a növények leveleiből végezzük el az NR meghatározást, hogy megfelelő nagyságú, megbízható NRA-értékeket nyerjünk. Például, ADAMS és ATTIVILL (1982) ausztráliai erdők négy uralkodó fafajtájánál (*Eucalyptus regnans*, *Eucalyptus obliqua*, *Pinus radita*, *Acacia dealbata*) 1 év leforgása alatt 8-9 alkalommal vettek mind a fák gyökeréből mind a levelekből mintát. A négy fajtára NRA-értékei a következőképpen alakultak: Az *Eucalyptus obl.* gyökereiből alig lehetett NRA-t mérni, a levelek NRA-értékei pedig átlagosan 30-szor nagyobbak voltak a gyökerekben mért értékeknél; viszont a *Pinus rad.* és *Acacia dealb.* gyökereiben és leveleiben mérhető NRA-értékek aránya 1:1 volt, de az *Acacia dealb.* abszolút NRA értékei 10-szer nagyobbak voltak; végül az *Eucalyptus reg.* gyökereiben jól mérhető, de jelentősen (13-szor)

kisebb NRA-értékek mutatkoztak, mint a levelekben.

Hogy mely növényi részben jelentkezik nagyobb NRA-érték, az a növényfajon kívül a kísérleti körülményektől, valamint egyéb környezeti tényezőktől (évjárat) is függ (MULDER et al., 1959; GEBAUER et al., 1987; GEBAUER, 1989; KASTORI & PETROVIC, 1989a, b; PETROVIC & KASTORI, 1990).

Az NRA-érték és a növények kora

A növények korának előrehaladtával anyagcseréjük, N-metabolizmusuk is változik, így kézenfekvő, hogy az ezzel szoros kapcsolatban lévő NRA-értékek is változnak.

KASTORI és PETROVIC (1989b) ennek vizsgálatára 2 hetes kukorica-csíra-növények leveleit és gyökereit koruk szerint 3-3 csoportra bontotta. A leveleknél koruk előrehaladtával az "összes" NRA-érték csökkent, s a legfiatalabb levelek NRA-ja kb. másfélszerese volt a legidősebbeknek. A gyökereknél fordított helyzetet találtak, a legidősebb gyökerek NRA-értékei 2-3-szor voltak nagyobbak a legfiatalabbakénál. Hasonló módszerrel vizsgálták GEBAUER és munkatársai (1984) a *Rumex obtusifolius* L. növény NRA-értékeinek alakulását. A fiatal levelekből nagyobb NRA-értéket lehetett kimutatni, mint az idősebb levelekből akár szárazanyag-tartalomra számították az NRA-t, akár a zöld növényi anyag 1 g-jára.

A növények korának hatását a tenyészidő előrehaladásával - azonos kísérletből származó - más-más fejlődési fokon lévő növények elemzése útján vizsgálta EILRICH és HAGEMAN (1973), valamint GEBAUER et al. (1987).

GEBAUER és munkatársai (1987) különböző korú *Atriplex hortensis* L. és *Amaranthus retroflexus* L. növényeknél azt tapasztalták, hogy a fiatal növények

NRA-ja - akár sok, akár kevés nitrogént kaptak - jelentősen (6-10-szer) nagyobb volt, mint az idősebb növényeknél, valamennyi vizsgált növényi részben.

EILRICH és HAGEMAN (1973) szabadföldi kisparcellás kísérletben búzanövények N-metabolizmusát vizsgálta. A tenyészidő folyamán vett növényminták "redukált" (összes N-tartalom levonva a nitrát-N-tartalomtól) N-tartalma és az NRA-értékek között az egész vegetatív periódusra számítva is lineáris szignifikáns összefüggést kaptak. Az összefüggés még szorosabbá vált, amikor az adatokat a növények fejlődési foka alapján négy csoportba osztották: ekkor a lineáris korrelációs koefficiensek $r = 0,75^{**}$ és $0,89^{**}$ között voltak, de a négy egyenes meredeksége eltért egymástól, vagyis más jellegű volt az összefüggés az NRA-értékek és a red. N-tartalom között a növényi fejlődés egyes szakaszaiban.

Az NRA-értékek szezonális változása

Az NRA-értékeknek az év folyamán, ill. a vegetációs idő alatti változását, ingadozását a természetes növénytakaró vizsgálatakor figyelték meg.

HAVILL és munkatársai (1974) meszes talajon élő négy növényfajta esetében ugyanazon a termőhelyen, egy hónap alatt a mért NRA-értékek ingadozását ugyan tapasztalták, de szignifikáns eltérést nem észleltek.

Jóval hosszabb ideig, egy egész évig végezték megfigyeléseiket ADAMS és ATTIVILL (1982) Ausztráliában, ill. egy egész vegetációs periódus alatt HÖGBERG és munkatársai (1986) Svédországban.

ADAMS és ATTIVILL (1982) négy erdő 1-1 uralkodó fajtáját vizsgálták. Havi ill. két havi méréseik szerint a talaj nedvességtartalmának változását az egyik fajta esetében a gyökerekből mérhető NRA-érték követte, míg a másik három fajtánál a csapadékmennyiség alakulá-

sát, azaz az évszakok egymásra következését, kis késéssel a levelek NRA-értéke mutatta. HÖGBERG és munkatársai (1986) az általuk jelzőnövényként kiválasztott *Deschampsia flexuosa* L.-ből május vége és október közepe között 12 alkalommal vettek egy erdőirtáson és egy fenyőerdő aljnövényzetéből mintát. A nagy földrajzi távolság és a vizsgált növények igen különböző volta ellenére az látható az eredményekből, hogy mindkét kísérleti helyen azonos az NRA-értékek változásának iránya: tavasztól nyár felé haladva csökkennek, majd ősz ill. tél felé közeledve ismét emelkednek az értékek, ami természetesen összefügg az időjárásal (a csapadék mennyiségével) és a talajban lejátszódó N-átalakulási folyamatokkal (mineralizáció, nitrifikáció) is.

Az NRA-értékek napközbeni változása

Mivel a növények N-metabolizmusát a fényviszonyok is befolyásolják, ezért az NR-enzim mennyiségére és aktivitására is hatással van a fényviszonyok napközbeni változása.

GEBAUER és munkatársai (1984) egy tenyészedény-kísérletben a klímakamrában tartott *Rumex obtusifolius* L. növényeken azt tapasztalták, hogy az NRA-értékek a világos fázis kezdetétől (reggel 6 h) folyamatosan emelkedtek, s a sötétség beálltával sem azonnal kezdtek csökkenni, hanem 18 h körül egy maximum jelentkezett (a reggeli értékek 2-4-szerese) s csak ezután indult meg az értékek csökkenése, ami kb. éjfélkor érte el a mélypontot, hogy ezután ismét növekedve reggel 6 órára beálljanak az előző reggelen mért értékekhez hasonló értékek.

Ugyanebben a kísérletben a tenyész-edények másik felére, ill. egy későbbi (GEBAUER, 1989) *Atriplex hort.* L. és *Amaranthus retrofl.* L. növényekkel végzett tenyészedény-kísérletben a növényeket szabadban tartották. Ekkor az

NRA-értékek napközbeni változása nem volt olyan szabályos, mint a klímakamrában, de a világos fázisban mindig nagyobbak voltak az értékek és maximumukat kb. 15 órakor (a max. besugárzás idején) érték el. Majd csökkenés következett (1989-es kísérletben éjjélkor még egy kisebb maximum mutatkozott), mely hajnali 3 órakor érte el a legkisebb értékeket, s reggel 6-kor ismét kb. az előző reggeli értékeket lehetett mérni. A napi átlagos maximum és minimum között 32-51 % volt az eltérés.

GEBAUER 1989-es kísérletében nemcsak az egész növényből, hanem az egyes növényi részekből mérhető NRA-értékek napi változását is mérte. Az egyes növényi részekben az ingadozás nagysága és a maximális érték megjelenésének időpontja is eltérő volt. Az Atriplex hort.-nél a levéllemezekben és a levélnyél-főhajtás frakcióban mért NRA-értékek napközbeni változása megközelítően azonos volt. Az Amaranthus retrof.-nál a levéllemezekben mért NRA-értékek az egész nap folyamán nagyobbak voltak, mint a levélnyél + főhajtás frakcióban mértek. a gyökerek esetében mindkét növénynél az egész nap folyamán a legkisebb értékeket mérte, viszont előbb jelent meg a maximum, mint a föld feletti részekben, az éjjél körüli minimum pedig nem jelentkezett.

A fény hatása az NRA-értékekre

Az NRA-értékeknek mind a nap folyamán bekövetkező, mind a szezonális változása kisebb-nagyobb mértékben a fényintenzitás változásának a következménye is. A fénynek az NRA-értékekre gyakorolt hatását kísérletekben közvetlenül is vizsgálták. BEEVERS és HAGEMAN (1969) megvilágított árpanövényeket nitráttal trágyáztott, s ekkor a levelekben nagyobb NRA-értékeket mért, mint megvilágítás nélkül. PETROVIC és KASTORI

(1991) üvegházi körülmények között a nappali fényintenzitás mellett, valamint ennek 60 és 30 %-át biztosítva nevelte három búza-genotípus csíranövényeit. Mindhárom típusnál azt tapasztalta, hogy a fényintenzitás csökkenésével a növényekből meghatározható NRA-értékek is kisebbek lettek. Egy másik kísérletben PETROVIC és munkatársai (1991) cukorrépa csíranövények egy-egy csoportját más-más hullámhosszúságú fénnel megvilágítva nevelte. A legnagyobb NRA-értékeket a fehér (kevert) fénnel megvilágított növényekben mérték. MULDER és munkatársai (1959) üvegházi kísérletben karfiolnövények egy részét 2 napig sötétben tartották. Ezeknél a növényeknél kisebb NRA-értékeket mértek, mint a fény hatása alatt lévőknél. HÖGBERG és munkatársai (1986) természetes körülmények között élő Deschampsia flex. növényeknél is ki tudta mutatni a fény hatását: az erdő aljnövényzetéből vett mintáknál mindig kisebb NRA-értékeket határoztak meg, mint az erdőirtásról származó növénymintáknál.

A tápközeg (talaj, tápoldat) pH-jának hatása az NRA-értékekre

BIGG és DANIEL (1978) $\text{NO}_3\text{-N}$ -t is hasznosító Pinus contorta Dougl. fenyőfajta csemetéit 4,6, 5,3 és 6,0 pH-jú, egyébként azonos összetételű tápoldatban nevelte, majd meghatározta a gyökerekből és a hajtásokból az NRA-értékeket. A legnagyobb NRA-értékeket mind a gyökerekből, mind a hajtásokból a 6,0 pH-jú tápoldatban nevelt növényeknél lehetett mérni.

HAVILL és munkatársai (1974) természetes körülmények között, meszes és savanyú talajokon élő növénytárulásokban vizsgálták az NRA-értékek alakulását. Vizsgálataik során találtak egy olyan termőhelyet, ahol meszes rendzina és savanyú barnaföld foltokban, szorosan egy-

más mellett helyezkedett el. Az erről a területről vett növényminták többségénél azt tapasztalták, hogy a savanyú talajon növények NRA-értékei kisebbek, mint a meszes rendzinán élőké.

Az NRA-érték meghatározása

Azt a tényt, hogy a növényekben a nitrát nitritté történő redukciója enzimatiкус úton megy végbe, már közel 90 éve megállapították (KASTLE & ELVOVE, 1904), és már majdnem 40 éve bebizonyították a nitrát-reduktáz enzim létezését (EVANS & NASON, 1953), ennek ellenére az enzim meghatározásának módja körül még mindig sok a nyitott kérdés.

Régebben ún. "in vitro" eljárással határozták meg az NR-enzimet, melynek során a növényi anyagot kvarchomokkal eldörzsölve a sejtek falát elroncsolták és az így nyert kivonatból határozták meg az enzim mennyiségét, ill. aktivitását. Ezzel szemben MULDER és munkatársai (1959) egy "in vivo" eljárást dolgoztak ki. Ma széles körben ezt használják.

Ennél az eljárásnál a meghatározáshoz felhasznált növényi részeket felaprítják ugyan, de nem dörzsölik el, majd bemérés után egy ún. inkubációs közegbe vagy oldatba helyezik. Egyes esetekben vákuum-infiltrációt végeznek, majd az edény lezárják és a levegőt kiszívadják belőle. Az inkubációt vagy vákuumban, vagy N_2 -atmoszférában (ritkán argon atmoszférában) végzik: az edényeket sötétben, 20-37 °C hőmérsékleten és az egyes módszerek által előírt ideig (10-240 perc) állni hagyják. Az inkubáció befejezése után megfelelő aliquot részt vesznek ki az oldatból és a keletkezett nitrit mennyiségét N-(naftil-1)-etiléndiamin-diklorid (= NNED) + szulfanilamid reagenssel fotometriás úton határozzák meg.

Bár a redukció során keletkezett nitritnek csak egy része van jelen az inkubációs oldatban, JAWORSKI (1971) az így

mérhető mennyiséget vette az NR-enzim aktivitásának mértékéül, és mértékegységeként a NO_2 $\mu g/g$ száraz anyag/óra-t javasolta.

Az "in vivo" eljárás JAWORSKI (1971) szerint - főként az általa javasolt módoszat - egyszerű, gyors, számos minta egyidejű elemzésére azaz sorozatvizsgálatokra alkalmas, s könnyen adaptálható az egyes növényekre, azonban a következőkből kitűnik, hogy a meghatározás laboratóriumi elvégzése során is sok probléma merült fel.

A növényminta vétele, tárolása és előkészítése

A NRA-értékek meghatározásához általában a növények leveleit használják, de a vizsgálatok célja és a kísérleti növényekkel kapcsolatos ismeretek határozzák meg, hogy az egész növényt, vagy annak melyik részét használják fel.

A növénymintákból az NRA-értékeket a mintavétel után lehetőleg azonnal meg kell határozni, de ha ez valamilyen okból nem lehetséges, a mintákat alacsony hőmérsékleten (jégen vagy szárazjégen) kell tárolni és a lehető legrövidebb idő alatt be kell szállítani a laboratóriumba (HAGEMAN et al., 1980; ADAMS & ATTIVILL, 1982; HÖGBERG et al., 1986).

HÖGBERG és munkatársai (1986) vizsgálatai szerint a tárolás és a szállítás nem okoz túl nagy hibát, ha elegendő a relatív NRA-értékek ismerete, mert szedés után közvetlenül - az első 30 percen - ugyan jelentősen csökkennek az NRA-értékek, de ezután, kb. 3,5 órán át viszonylag állandó értékeket mértek.

A laboratóriumba beérkezett mintákat általában szobahőmérsékleten készítik elő a vizsgálatra, de ADAMS és ATTIVILL (1982) szerint célszerű az előkészítő műveleteket - egészen az inkubáció beindításáig - 0-4 °C közötti hőmérsékleten végezni.

A mintákat először hideg csapvízzel (1-2-szer), majd hideg desztillált vízzel (1-2-szer) leöblítik, ill. gyökerek és micélium estében a talajszemcsék eltávolítása céljából gondosan lemossák (JAWORSKI, 1971; BIGG & DANIEL, 1978; HO & TRAPPE, 1980; ADAMS & ATTIVILL, 1982).

Az "in vivo" eljárásra történő áttérés-kor MULDER és munkatársai (1959) megvizsgálták, hogy a növénymintákat mekkorára kell felaprítani. Méréseikből kiderült, hogy a legnagyobb NRA-értéket a legdurvábbra vágott növénymintánál kapták, ezzel bizonyítva, hogy a nitrát redukciója főleg az ép, nem sérült sejtekben megy végbe. Ennek alapján a levélmintákat 2-10 mm-es darabokra, vagy 5-10 mm átmérőjű korongokra, a gyökereket és szárazakat 1-2 mm hosszú darabokra aprítják.

A felaprított növénymintából 100-1000 mg-ot mérnek be a meghatározáshoz. Ha kevés a növényi anyag, akkor az egész növényt is felhasználhatják a méréshez.

A bemért növényi anyagot olyan edénybe helyezik, melybe már előzetesen 2-20 cm³-nyi ún. inkubációs oldatot adagoltak, melynek a növénymintát teljesen el kell fednie. Az edénynek fényt át-nem-eresztőnek és jól zárhatóknak kell lennie. Olyan fedővel kell rendelkeznie, mely vákuum előállítását és gáz bevezetését lehetővé teszi.

Az inkubációs oldat összetétele

Az inkubációnál használt oldat KNO₃-ot, a közeg pH-ját biztosító puffer oldatot - legtöbbször foszfát-puffert - és egy alkoholt - elsősorban n-propanolt-tartalmaz. Esetenként egy elektron-donorként szolgáló vegyületet (pl. cukrot, szerves savat, stb.) is adnak hozzá.

Ennek az oldatnak az összetételével kapcsolatban HAGEMAN és HUCKLESBY

(1971) megállapítja, hogy minden növényfajta vizsgálatánál újból ki kell mérni az inkubáció optimális körülményeit.

Az inkubációs oldat KNO₃-koncentrációja

CANVIN és WOO (1979) eleinte olyan inkubációs oldattal dolgoztak, mely nem tartalmazott nitrátot. (Ilyen oldatot használtak a későbbiekben HAGEMAN és munkatársai (1980), továbbá KASTORI és PETROVIC (1989a,b) is, utóbbiak az így kapott NRA-értékeket "kezdeti NRA-értékeknek" nevezik.) Mivel ily módon CANVIN és WOO nagyon kis értékeket kaptak - még akkor is, amikor a növényeket nitráttartalmú tápközegben nevelték - az inkubációs oldatba KNO₃-ot adtak, s így 3-15-ször nagyobb NRA-értékeket mértek.

A KNO₃-koncentráció optimális értékét JAWORSKI (1971), CANVIN és WOO (1979) és GEBAUER és munkatársai (1984) 20 és 50 mM közöttinek találták. Ezzel szemben HAVILL és munkatársai (1974), akik természetes növénytakaróból származó növényeket vizsgáltak, az optimális KNO₃-koncentrációt 50-200 mM között állapították meg.

Az NRA-meghatározás mechanizmusánál azt feltételezik, hogy az inkubációs oldatban adott nitrát belép a sejtekbe, ott a jelenlévő NR-enzim nitráttá redukálja, majd a nitrit kilép a sejtekből az inkubációs oldatba, ezért merül fel az a kérdés, hogy a sejtekben lévő nitrát befolyásolja-e ezt a folyamatot. GEBAUER és munkatársai (1984) mérései szerint két, ugyanahhoz a növényfajhoz tartozó, de nitrátot igen eltérő mennyiségben tartalmazó növény esetében az inkubációs oldat optimális KNO₃-koncentrációjára nézve azonos értéket (40 mM) kaptak.

Ugyancsak GEBAUER és munkatársai (1984) vizsgálták meg, hogy elég gyors

san lép-e be a nitrát az inkubációs oldatból a sejtekbe. Eredményeik szerint az inkubáció kezdetétől számítva 30-120 percig megközelítően azonos NRA-értékeket kaptak.

Az inkubációs oldat KH_2PO_4 koncentrációja és pH-ja

Mivel az inkubáció során a sejtekből szerves savak is lépnek ki, fontos, hogy az inkubációs oldat ezek hatását pufferolni tudja. Ehhez leggyakrabban a KH_2PO_4 -gyel készült foszfátpuffert használják, s az oldat pH-ját foszforsavval vagy lúggal állítják be a kívánt értékre. Az inkubációs oldat optimális KH_2PO_4 -koncentrációja JAWORSKI (1971), HAVILL és munkatársai (1974) szerint 0,1 M, míg GEBAUER és munkatársai (1984) szerint 0,25 M.

KH_2PO_4 -et tartalmazó pufferoldat helyett BIGG és DANIEL (1978) Na_2HPO_4 +citromsavból készített puffert használ, míg HAGEMAN és munkatársai (1980), valamint ADAMS és ATTIVILL (1982) a sejtmembrán kevésbé károsító CaSO_4 -oldatot tartják előnyösebbnek.

Az inkubációs oldat optimális pH-ját JAWORSKI (1971), PRAKASH és NAIK (1982), valamint GEBAUER és munkatársai (1984) vizsgálták részletesen. Szerintük megfelelő nagyságú és konstans NRA-értékeket akkor lehet kapni, ha az inkubációs oldat pH-ja 7-7,5, esetleg 8 körül van.

PRAKASH és NAIK modellkísérletben megvizsgálták az inkubáció során keletkezett nitrít pH-érzékenységét is. A 6-8 pH-jú inkubációs oldatokból a bemért nitrítet csaknem 100 %-ban vissza lehetett mérni, míg az ennél alacsonyabb pH-jú oldatok esetében (pH = 2,0-ig mérve) 17-87 %-os nitrít-vesztéssel állapítottak meg. Amikor azonban az inkubáció befejezése után az oldatok pH-ját egységesen 7,5-re állították be, s ennél a pH-

nál végezték a nitrít meghatározását (ill. az NRA-mérését), akkor a végig 7,5 pH-n tartott oldat NRA-értékét 100-nak véve, a 3-7 pH-n végzett inkubáció után az NRA-értékek 90-120-nak adódtak. Ebből úgy tűnik, hogy a pH-értéke nem az inkubáció során, hanem a NRA-(nitrít-) meghatározás során befolyásolja a végeredményt.

Az inkubációs oldat n-propanol koncentrációja

Az inkubációs oldat harmadik - bár pl. ADAMS és ATTIVILL (1982) szerint el is hagyható - komponense valamilyen szerves oldószer, általában alkohol, a legtöbb leírás szerint n-propanol. Ezeknek a szerves oldószereknek az a hatása, hogy a sejtek átjárhatóságát megnövelik. Így az oldat nitrátja könnyebben tud belépni a sejtekbe, majd a keletkezett nitrít könnyebben tud kilépni belőlük (JAWORSKI, 1971; HAVILL et al., 1974). További hatásuk JAWORSKI (1971) szerint az, hogy a növényi szövetekben anaerob körülmények jönnek létre, s ezért nem szükséges a meghatározást anaerob körülmények között végezni.

A megfelelő alkohol keresése során megvizsgálták a metanol (JAWORSKI, 1971), az etanol (JAWORSKI, 1971; CANVIN & WOO, 1979) és az n-propanol (JAWORSKI, 1971; HAVILL et al., 1974; CANVIN & WOO, 1979; GEBAUER et al., 1984) hatását az NRA-értékek alakulására. Amikor az inkubációs oldat 5 tf% metanolt is tartalmazott, JAWORSKI (1971) 85 %-kal nagyobb NRA-értékeket mért aerob körülmények között. 3-5 tf% etanollal 2-2,2-szeresére emelkedtek az NRA-értékek mindkét említett kutatónál, bár JAWORSKI (1971) aerob, CANVIN és WOO (1979) pedig anaerob körülmények között végezte a mérést.

A legrészletesebben az n-propanol hatását vizsgálták. Az optimális n-pro-

panol koncentrációt keresve JAWORSKI (1971) és CANVIN és WOO (1979) 0-10 tf% között változtatta az n-propanol mennyiségét, s azt 3-5 tf% között találták meg. CANVIN és WOO (1979) aerob és anaerob körülmények között végzett mérőssorozatokból azt is kimutatták, hogy 5 tf% n-propanol-koncentráció esetében a kétféle módon meghatározott NRA-értékek kb. azonosak. Szerintük ezért tudott JAWORSKI (1971) aerob körülmények között dolgozni. HAVILL és munkatársai (1974) és GEBAUER és munkatársai (1984) vákuum-infiltráció alkalmazásával és anaerob körülmények között az optimális n-propanol koncentrációt 1-2 tf% közöttinek találták.

Vákuum-infiltráció

Az inkubációs oldat beadagolása és a növényminta bemérése után, de még az inkubáció beindítása előtt ún. vákuum-infiltrációt alkalmaznak. E művelet folyamán az inkubációs edényből rövid időre (1-2 percre) kiszívják a levegőt, majd ismét helyreállítják az atmoszférikus nyomást. ezt a különböző leírások szerint 1-3-szor ismétlik meg, majd az utolsó levegő-kiszívás után általában N_2 -vel töltik meg az edényt, s anaerob körülmények között végzik az inkubációt (HAVILL et al., 1974; BIGG & DANIEL, 1978; CANVIN & WOO, 1979; HAGEMAN et al., 1980; PAKASH & NAIK, 1982; GEBAUER et al., 1984; MARTINEZ & CERDÁ, 1989; GONZALEZ PONCE et al., 1990).

JAWORSKI (1971) szerint az n-propanol jelenléte az inkubációs oldatban biztosítja az anaerob körülményeket, s ezért sem vákuum-infiltrációra, sem N_2 -atmoszférára nincs szükség a meghatározásnál. Emiatt GEBAUER és munkatársai (1984) ismét megvizsgálták ezt a kérdést. Mérési eredményeik szerint n-propanol jelenlétében is mindig nagyobb NRA-ér-

tékeket kaptak, ha vákuum-infiltrációt is alkalmaztak.

Az anaerob körülmények, ill. az O_2 jelenlétének hatása az NRA-értékekre

A feldolgozott irodalomban egyedül JAWORSKI (1971) közöl olyan eljárást, mely aerob körülmények között végezhető.

Az O_2 jelenlétének hatását CANVIN és WOO (1979) vizsgálták meg részletesen az inkubációt 0-21 tf% O_2 -t tartalmazó gázelegyen végezve oly módon, hogy a gázt vagy az oldat fölött keringtették vagy átbuborékolatták rajta. Az oldat fölött keringtetett gázelegyen 0-12 tf% O_2 -tartalom mellett még nem hatott a mért NRA-értékekre, de az átbuborékolatott gázelegyen a legcsekélyebb O_2 mennyiség jelenlétében is az NRA-értékek csökkenésével járt. 1 tf% O_2 -nél többet tartalmazó gázelegyen esetében az NRA-értékek - az adagolás módjától függetlenül - rohamosan csökkentek, s a levegő O_2 -tartalmát elérve (21 tf%) 0 körül mozdogtak.

HAGEMAN és munkatársai (1980) ugyanezt a kérdést vizsgálta más oldalról. Hogy az inkubációs rendszert a levegő nyomaitól megszabadítsák, még az inkubáció megkezdése előtt N_2 -gázt vezettek át rövid ideig (45-180 mp) az oldaton és az edényen. Ha ezután az inkubációt aerob körülmények között végezték, nem kaptak mérhető NRA-értékeket. Ha viszont az inkubációt N_2 -atmoszférában végezték, megfelelő nagyságú NRA-értékeket kaptak. Érdemes megjegyezni, hogy a legnagyobb NRA-értékeket akkor kapták, mikor óránként 55 percen át N_2 -gázt és 5 percen át levegőt buborékolattak át az oldaton. Olyan kísérlet-sorozatot is végeztek, hogy a N_2 -atmoszférában végzett inkubáció során egyes edényeket bizonyos idő elteltével (pl. 1-1 óra) átkapcsoltak levegő adagolásra. Ekkor azt tapasztalták, hogy ha az inku-

báció elég hosszú ideig folyt N_2 -atmoszférában (legalább 2 óra), akkor a nitrít képződés nem állt le azonnal, s az NRA-értékek vagy állandóak maradtak, vagy még nőttek is egy ideig. Ennek fordítottját is megvizsgálták, s a 3 óra hosszat levegő-atmoszférában végzett inkubációt (ahol minimálisak voltak az NRA-értékek) ezután N_2 -atmoszférában folytatták. Innen kezdve az NRA-értékek jelentősen emelkedtek, s kb. 3 óra alatt elérték a csak N_2 -atmoszférában végzett inkubációval kapott értékeket.

Forrásban lévő vízfürdőben történő kezelés

Bár JAWORSKI (1971) az inkubációs oldatból meghatározható nitrít mennyiségét tette meg az NRA-érték mértékének, többen kimutatták, hogy az oldatban lévő nitrít nem azonos a sajtekben redukció közben keletkezett nitrít mennyiségével. A nitrít jobb kinyerése céljából PRAKASH és NAIK (1982) az előttük már többek által az enzimes redukció befejezésére alkalmazott eljárást vizsgálták meg részletesebben: az inkubációs idő elteltevel az edényeket rövid időre (5 percre) forrásban lévő vízfürdőbe helyezték. Ennek a kezelésnek eredményeképpen - bármilyen pH-jú is volt az inkubációs oldat - jelentősen nagyobb (2-10-szeres) mennyiségű nitrítet lehetett meghatározni, mint e kezelés nélkül.

Egyes metabolitok és enzim inhibitorok hatása a NRA-értékek alakulására

Egyrészt az enzimes nitrát-redukció mechanizmusának feltárása, másrészt az eljárás egyszerűsítése és nagyobb NRA-értékek elérése érdekében többen vizsgálták az enzimes redukcióval kapcsolatos élettani folyamatok közbenső termékeinek és a folyamatokban részt vevő en-

zimek aktív helyeit gátló vegyületeknek (pl. malát, jodo-acetát, stb.) hatását az NRA-értékek alakulására.

Az amytal és a rotenon - mindkettő a cytochrom oxidáz enzim I. sz. foszforilező helyének inhibitora - emelkedő mennyiségekben adva, sem aerob, sem anaerob körülmények között nem befolyásolja jelentősen az NRA-értékek alakulását (CANVIN & WOO, 1979).

A jodoacetát (mely a glükolízis egyik inhibitora) és az arzenit (mely egy respirációs inhibitor) önmagukban adva aerob és anaerob körülmények között egyaránt csökkentik az NRA-értékeket (WOO & CANVIN, 1980).

A malonát (mely a trikarboxilsav ciklus egyik inhibitora) önmagában adva, anaerob körülmények között csökkenti az NRA-értékeket (HAGEMAN et al., 1980; WOO & CANVIN, 1980; PRAKASH & NAIK, 1982).

Míg PRAKASH és NAIK (1982) azt tapasztalták, hogy a malát gyakorlatilag nem változtatja meg az NRA-értékeket anaerob körülmények között, addig HAGEMAN és munkatársai (1980), továbbá WOO és CANVIN (1980) vizsgálatai szerint, ugyancsak anaerob körülmények között, a malát növekvő adagjai egyre jobban fokozták a nitrít akkumulációt - azaz emelték az NRA-értékeket.

Amikor a malátot és a malonátot együttesen adták az inkubációs oldatba, akkor az NRA-értékek emelkedtek ugyan, de kisebb mértékben, mint amikor csak malátot adagoltak (HAGEMAN et al., 1980; WOO & CANVIN, 1980).

Az NRA-értékek alakulására a legjelentősebb hatást az "antimycin A" (a cytochrom oxidáz enzim II. sz. foszforilező helyének inhibitora) és a DCMU (3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea) fejtik ki. Az antimycin A aerob körülmények között jelentősen fokozza a nitrít akkumulációt, s adagjait növelve az még tovább fokozódott. A DCMU adagolás pedig azt eredményezte, hogy a megha-

tározást nem kell sötétben végezni. A két vegyületet kombinálva is lehet adni, s ekkor aerob körülmények között fény behatása melletti lehet dolgozni (CANVIN & WOO, 1979; WOO & CANVIN, 1980).

Az irodalom adatait áttekintve megállapítható, hogy az NRA-értékek alakulását rendkívül sok tényező befolyásolja, nagyságuk számos környezeti, külső és növényen belüli tényezőtől függ. A talajok adottságai mellett, a fény ill. a nap-sugárzás intenzitásának hatása alatt ingadoznak az értékek a nap folyamán, az évszakok során, a fény és árnyék változásának hatására, de a hőmérséklet-változás, a növények víz- és tápanyag-ellátottsága, a hormontartalmú anyagokkal és a növényvédő szerekkel történő kezelése, valamint a környezet nehézfémekkel történő szennyezése is befolyást gyakorolnak rájuk. A belső tényezők közül a növényfaj, a genetikai adottságok, valamint a növény kora játszik fontos szerepet az NRA-értékek nagyságának alakulásában.

Az NRA-értékek meghatározását - JAWORSKI (1971) kivételével - valamennyi szerző anaerob körülmények között végzi, amihez speciális felszerelés szükséges. Látható az irodalomból az is, hogy a meghatározás paramétereit kísérletenként külön-külön kell optimalizálni, hogy megfelelő nagyságú, jól mérhető eredményeket kapjanak. A mért eredmények reprodukálhatóságával az idézett irodalom nem foglalkozik.

Az utóbbi problémakör tisztázása azért is fontos kérdés, mert egyes felvételek szerint az NRA-értékeket a trágyázási szaktanácsadásban is fel lehetne használni. Ezzel kapcsolatban EILRICH és HAGEMAN (1973), valamint GONZÁLEZ PONCE és munkatársai (1990) végeztek méréseket és korreláció-számításokat. Eredményeik szerint a búzanövények különböző fejlődési stádiumaiban meghatározott NRA-értékek szignifikáns összefüggésben álltak az adott N-trágya-ada-

gokkal, a búza szemtermésével és a szemek proteintartalmával. Ennek ellenére még igen sok vizsgálatra, kalibrációs munkára van szükség, míg az NRA-értékek a talaj N-(NO₃-N) ellátottságának egyértelmű jelzőszámai lehetnek.

Irodalom

- ADAMS, M. A. & ATTIVILL, P. M., 1982. Nitrogen mineralization and nitrate reduction in forests. *Soil Biol. Biochem.* **14**, 197-202.
- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R. H., 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**, 495-522.
- BIGG, W. L. & DANIEL, T. W., 1978. Effects of nitrate, ammonium and pH on the growth of conifer seedlings and their production of nitrate reductase. *Plant & Soil.* **50**, 371-385.
- CANVIN, D. T. & WOO, K. C., 1979. The regulation of nitrate reduction in spinach leaves. *Can. J. Bot.* **57**, 1155-1160.
- EILRICH, G. L. & HAGEMAN, R. H., 1973. Nitrate reductase activity and its relationship to accumulation of vegetative and grain nitrogen in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Science.* **13**, 59-66.
- ELLENBERG, H., 1977. Stickstoff als Standortsfaktor, insbesondere für mitteleuropäische Pflanzengesellschaften. *Oecol. Plant.* **12**, 1-22.
- EVANS, H. J. & NASON, A., 1953. *Plant Physiol.* **28**, 233-254. cit in: BEEVERS, L. & HAGEMAN, R. H., 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**, 495-522.
- GEBAUER, G., 1988. Carbon, nitrogen and water use of C₃, C₄ and CAM plants. *Acta Horticult.* **229**, 73-84.
- GEBAUER, G., 1989. Diurnal changes of nitrate content and nitrate reductase activity in different organs of *Atriplex hortensis* L. (C₃ plant) and *Amaranthus retroflexus* L. (C₄ plant). Manuscript for the Proc. XI. Int. Plant Nutrition Colloquium, Wageningen.

- GEBAUER, G., MELZER, A. & REHDER, H., 1984. Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolius* L. I. Differences in organs and diurnal changes. *Oecologia* (Berlin). **63**. 136-142.
- GEBAUER, G., REHDER, H. & WOLLENWEBER, B., 1988. Nitrate, nitrate reduction and organic nitrogen in plants from different ecological and taxonomic groups of Central Europe. *Oecologia* (Berlin). **75**. 371-385.
- GEBAUER, G. et al., 1987. Biomass production and nitrate metabolism of *Atriplex hortensis* L. (C₃ plant) and *Amaranthus retroflexus* L. (C₄ plant) in cultures at different levels of nitrogen supply. *Oecologia*. **72**. 303-314.
- GONZÁLEZ PONCE, R., SALAS, M. L. & LAMELA, A., 1990. Nitrate reductase activity, grain yield and grain protein in wheat (*Triticum aestivum*) as affected by nitrogen fertilization under semi-arid conditions. In: *Plant Nutrition - Physiology and Applications*. (Ed.: BEUSICHEM, VAN M. L.) 561-564. Kluwer Academic Publishers.
- HAGEMAN, R. H. & HUCKLESBY, D. P., 1971. Nitrate reductase from higher plants. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 23. (Ed.: SAN PIETRO, A.). 491-503. Academic Press. London - New York.
- HAGEMAN, R. H. et al., 1980. Some new aspects of the "in vivo" assay for nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiol.* **65**. 27-32.
- HAVILL, D. C., LEE, J. A. & STEWART, G. R., 1974. Nitrate utilization by species from acidic and calcareous soils. *New Phytol.* **73**. 1221-1231.
- HO, I. & TRAPPE, J. M., 1980. Nitrate reductase activity of non-mycorrhizal Douglas-fir rootlets and of some associated mycorrhizal fungi. *Plant & Soil.* **54**. 395-398.
- HÖGBERG, P. et al., 1986. Plant nitrate reductase activity as an indicator of availability of nitrate in forest soils. *Can. J. Forest Res.* **16**. 1165-1169.
- JAWORSKI, E. G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **43**. 1274-1279.
- KASTLE, A. T. & ELVOVE, E., 1904. *Am. Chem. J.* **31**. 606-614. cit in: BEEVERS, L. & HAGEMAN, R. H., 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**. 495-522.
- KASTORI, R. & PETROVIC, N., 1989a. Effect of boron on nitrate reductase activity in young sunflower plants. *J. Plant Nutr.* **12**. 621-632.
- KASTORI, R. & PETROVIC, N., 1989b. Verteilung der Nitratreduktaseaktivität in Spross und Wurzeln junger Maispflanzen (*Zea mays* L.) bei unterschiedlichem Nitratangebot. *Acta Bot. Croat.* **48**. 47-55.
- MARTINEZ, V. & CERDÁ, A., 1989. Nitrate reductase activity in tomato and cucumber leaves as influenced by NaCl and N source. *J. Plant Nutr.* **12**. 1335-1350.
- MELZER, A., GEBAUER, G. & REHDER, H., 1984. Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolius* L. II. Responses to nitrate starvation and nitrogen fertilization. *Oecologia*. **63**. 380-385.
- MULDER, E. G., BOXMA, R. & VEEN, VAN W. L., 1959. The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissues. *Plant & Soil.* **10**. (X) 335-355.
- PETROVIC, N. & KASTORI, R., 1990. Nitrate reductase in sugar beet genotypes supplied with different nitrate levels. In: *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*. (Eds.: EL BASSAM, N. et al.). 51-55. Kluwer Academic Publ.
- PETROVIC, N. & KASTORI, R., 1991. Effect of nitrate supply and light intensity on nitrate reductase activity, nitrogen concentrations and dry matter production in wheat genotypes. *Zemljiste i Biljka.* **40**. 149-158.
- PETROVIC, N., KASTORI, R. & RAJCAN, I. I., 1990. The effect of cadmium on nitrate reductase activity in sugar beet (*Beta vulgaris*). In: *Plant Nutrition - Physiology and Applications*. (Ed.: BEUSICHEM, VAN M. L.) 107-109. Kluwer Academic Publ.
- PETROVIC, N., KASTORI, R. & RAJCAN, I. I., 1991. Effect of cadmium on nitrate reductase activity in young sugar beet (*Beta vulgaris*) plants differently

- supplied with potassium. *Zemljiste i Biljka*. **40**. 29-36.
- PETROVIC, M., KASTORI, R. & PETROVIC, N. 1991. Effect of light quality on nitrate reductase activity in normal and mutant sugar beet plants. *Agrochimica*. **35**. 473-479.
- PETROVIC, N., RICHTER, R. & KASTORI, R., 1987. Effect of Pb, Cd, Hg and Fe on the performance of nitrate reductase in sugarbeet. *Dokladi Bolgarszkoj Akademii Nauk*. **40**. 103-105.
- PRAKASH, S. S. & NAIK, M. S., 1982. Reevaluation of in vivo assay of nitrate reductase activity in wheat leaves. *Plant Sci. Lett.* **25**. 9-14.
- WOO, K. C. & CANVIN, D. T., 1980. The role of malate in nitrate reduction in spinach leaves. *Can. J. Bot.* **58**. 517-521.

Érkezett: 1993. január 22.

THAMM FRIGYESNÉ
MTA Talajtani és Agrokémiai
Kutató Intézete, Budapest